

Short Report

Geobacillus kaustophilus D-アミノ酸脱水素酵素遺伝子の機能解析

推定 D-アミノ酸脱水素酵素遺伝子の解析

菅澤達希¹, 牟田口祐太¹¹ 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

近年、ヒトにおける D-アミノ酸と様々な疾患との関連性が明らかとなり、D-アミノ酸は有用な診断マーカーとして期待されている。一方、D-アミノ酸脱水素酵素は人工の電子伝達体に電子を供与する性質を持つことから、安価で簡便な新規 D-アミノ酸分析法として、D-アミノ酸脱水素酵素を利用した酵素分析法が検討されている。しかし、現在報告されている D-アミノ酸脱水素酵素は安定性や常温での活性の高さに課題があり、D-アミノ酸脱水素酵素を利用した酵素分析法は確立されていない。本研究では、中等度好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* JCM 12893 由来の推定 D-アミノ酸脱水素酵素遺伝子 (GK1399) の発現タンパク質の D-アミノ酸脱水素酵素活性を確認することを目的とした。GK1399 を遺伝子組換え大腸菌において大量に発現させ、活性染色法で酵素活性の検出を試みた結果、D-プロリンに対する D-アミノ酸脱水素酵素活性を確認した。本酵素は中等度好熱由来の酵素であることから、高い安定性と酵素活性を有した D-アミノ酸脱水素酵素である可能性が高く、D-アミノ酸酵素分析法への応用が期待できる。

キーワード：D-アミノ酸, 脱水素酵素, 好熱菌

タンパク質を構成する 20 種類の α -アミノ酸には、グリシンを除いて光学異性体である L 体と D 体が存在する。そして、自然界に存在するアミノ酸の殆どが L 体であることから、これまで生物は L-アミノ酸のみを利用しており、D-アミノ酸は生理機能を持たないと考えられてきた。しかし、近年の分析技術の向上により、様々な植物や動物（無脊椎動物からヒトを含む哺乳類等の高等動物）に遊離状態の D-アミノ酸が存在し、生命維持のための重要な機能を持つことが報告されている。特に、ヒトにおける D-アミノ酸の生理機能が注目されており、様々な疾患との関連性についても研究が進んでいる。例えば、D-セリンは脳内において、記憶や学習など高次機能制御に関与するグルタミン酸受容体のコ・アゴニストとして機能することが報告されており、アルツハイマーや統合失調症といった精神疾患との関係が指摘されている (Nishikawa, 2011; 上里, 2013)。また、D-アスパラギン酸は精巢内テストステロンの合成の促進を

担い、無精子症患者の精液・精漿中の D-アスパラギン酸濃度が有意に低下していることが報告されている (Katane & Homma, 2011; D'Aniello et al., 2005)。このように、D-アミノ酸は非常に有用な診断マーカーとして期待されており、簡便・迅速かつ低コストな D-アミノ酸分析法の開発が求められている。

D-アミノ酸脱水素酵素 (D-amino acid dehydrogenase: DADH; EC 1.4.99.1) は、D-アミノ酸を酸化的脱アミノ反応によってケト酸とアンモニアに分解する反応を触媒する (He et al., 2011; Olsiewski et al. 1980; Wild et al., 1974; Tsukada 1966; Jones and Venables 1983)。その際、基質から抜き取った電子をフラビンやユビキノンといった電子受容体に渡す。また、これまでに報告されている DADH はいずれも人工の電子伝達体に電子を供与する。このことから、DADH をセンサー素子とした分光光学的又は電気化学的 D-アミノ酸酵素分析法が検討されており、安価で簡便な新規 D-アミノ酸分析法として期待されている。例

えば、分光光学的なD-アミノ酸酵素分析法としてテトラゾリウム塩のホルマザン発色を検出する方法がある。また、電気化学的なD-アミノ酸酵素分析法として、酵素反応によって電子伝達体に供与された電子を電極に渡すことで、流れる電流を検出する方法がある。しかし、現在報告されているDADHの多くは安定性が低く、酵素分析法への応用に至っていない。また、安定性の高いDADHとして、高度好熱菌や超好熱性アーキア由来のものが報告されているが (Satomura et al., 2002; Satomura et al., 2014), 常温での活性が非常に低いことが課題となっている。

私たちはこれまでに、*Geobacillus kaustophilus* JCM 12893のゲノム中に推定DADH遺伝子 (Locus tag: GK1399) を見出している。*G. kaustophilus* JCM 12893は生育温度範囲が42~74°C、最適生育温度が60°Cの中等度好熱菌であり、高い安定性と酵素活性を有したDADHを見出すことが期待できる。

本研究では、この *G. kaustophilus* 由来推定 DADH を遺伝子組換え大腸菌において大量に発現させ、DADH活性を見出すことに成功したので、これを報告する。

材料と方法

菌株と培養条件

G. kaustophilus JCM 12893 は Japan Collection of Microorganisms (JCM) より購入し、ゲノム DNA の遺伝子資源として利用した。この菌株を 1 L の Luria-Bertani 培地を用いて 60°C, 14 時間振盪培養し、菌体を得た。

GK1399 遺伝子のクローニングと発現プラスミドの構築

G. kaustophilus JCM 12893 のゲノム DNA は、1 L 培養液から得られた菌体をリゾチーム処理で溶菌した後、フェノール/クロロホルム抽出法にて得た。*G. kaustophilus* JCM 12893 のゲノム中に保存されている GK1399 領域を、KOD Plus Neo DNA polymerase (東洋紡, 大阪, 日本) を用いた PCR によって増幅した。PCR には Forward 側のプライマーとして、5'-CATATGAAGTACATCATCGTCGGAGCCG-3' を

使用し、Reverse 側のプライマーとして、5'-CTCGAGTCATTGAACGATCGGTGCG-3' を使用した。これらのプライマーは GK1399 遺伝子の塩基配列を基にして設計した。PCR によって増幅した 1,125-bp の DNA 断片を In Fusion クローニング (タカラバイオ, 大津, 日本) によって、発現用ベクター pET21a (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) の制限酵素領域 Nde I, Xho I 間に導入した。

大腸菌での組換えタンパク質の大量発現と抽出

大腸菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) (La Jolla, CA) を、発現用ベクター pET21a_GK1399 を用いて形質転換した後、形質転換株を 1 L の LB 培地 (100 µg/ml アンピシリン含有) にて、37°C で振盪培養した。培養液の OD₆₀₀ 値が 0.5 に達した時点で、終濃度 0.1 mM の isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside を添加し、37°C で 3 時間の振盪培養を行った。その後、菌体を遠心分離 (6,500 × g, 10 分間, 4°C) にて集菌した。得られた菌体 (湿重量 2.2 g) を 20 mL の 50 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 7.2) に懸濁し、超音波破碎機を用いて溶菌した。菌体破碎液を遠心分離 (10,000 × g, 30 分間, 4°C) し、その上清を組換えタンパク質溶液として実験に使用した。

ディスクゲルを用いた Native-PAGE

組換えタンパク質溶液に含まれる目的タンパク質を、Native-PAGE を用いて、アクリルアミドゲル中で他のタンパク質と分離し、濃縮した。表 1 に組成を示したディスクゲルに組換えタンパク質溶液 200 µL をアプライし、ディスクゲル 1 本当たり 3 mA の電流で約 90 分間の電気泳動を行った。

活性染色法による DADH 活性の検出

Native-PAGE 後のディスクゲルを表 2 に示す DADH 活性検出用の反応液に浸し、恒温槽を用いて、50°C で反応を行った。基質には D-アラニン (D-Ala), D-アスパラギン酸 (D-Asp), D-セリン (D-Ser), D-フェニルアラニン (D-Phe), D-メチオニン (D-Met), D-トリプトファン (D-Trp), D-ノルロイシン (D-Nle), D-プロリン (D-Pro) をそれぞれ用い、補酵素は等濃度のニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

(NAD), ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP), フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)混合物を使用した. 30 分間の反応の後, DADH の活性を示す活性バンドの有無を確認した.

表 1 ディスクゲル組成

濃縮ゲル	250 μ L / 1 本
0.47 M Tris-HCl (pH 6.9)	30 μ L
10%アクリルアミド+ 2.5%Bis-アクリルアミド	625 μ L
1.5% 過硫酸アンモニウム	21 μ L
<i>N,N,N',N'</i> -テトラメチルエタン-1,2-ジアミン	2 μ L
H ₂ O	423 μ L
分離ゲル	1200 μ L / 1 本
3 M Tris-HCl (pH 8.9)	150 μ L
30% アクリルアミド + 0.8% Bis-アクリルアミド	300 μ L
1.5% 過硫酸アンモニウム	60 μ L
<i>N,N,N',N'</i> -テトラメチルエタン-1,2-ジアミン	2 μ L
H ₂ O	688 μ L

表 2 活性染色反応液組成 (5.00 mL / 1 本)

1 M リン酸 Na 緩衝液 (pH 8.0)	1.50 mL
100 mM 基質	0.50 mL
10 mM 補酵素	0.10 mL
0.4 mM mPMS	0.50 mL
1 mM INT	0.50 mL
H ₂ O	1.90 mL

注 mPMS : 1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate
INT: Iodophenyl nitrophenyl phenyl tetrazolium chloride

結果

GK1399 発現タンパク質の DADH 活性解析

大腸菌で発現させた GK1399 の組換えタンパク質を用いて, 活性染色法による DADH 活性の検出を試みた. その結果, D-Pro を基質とした場合にのみ, 活性バンドが確認できた (図 1). また, この D-Pro を基質とした際に確認された活性バンドは, NAD, NADP, FAD といった補酵素を反応液に含まない場合でも確認された.

考察

本研究の結果から, *G. kaustophilus* JCM 12893 がもつ遺伝子 GK1399 の発現タンパク質が D-Pro を基質とする DADH である可能性が示唆された. 本酵素活性は NAD, NADP, FAD といった補酵素を反応液に含まない場合でも確認された. これまでに報告されている多くの DADH は, 自然界では FAD を

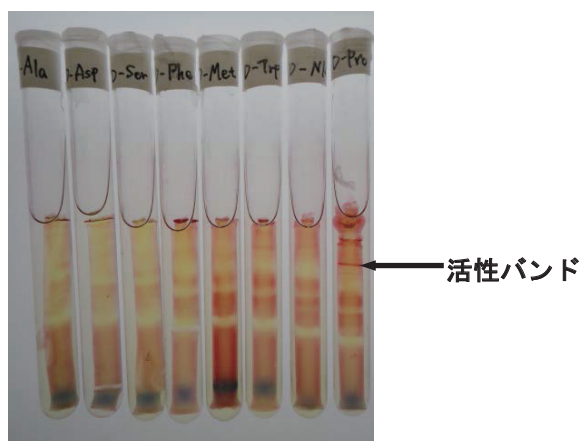


図 1 活性染色による DADH 活性の検出

右から D-Ala, D-Asp, D-Ser, D-Phe, D-Met, D-Trp, D-Nle, D-Pro を基質とした結果.

補酵素としつつ, 2,6-dichloroindophenol や phenazine methosulfate といった人工色素も電子受容体とする. このことから, 本酵素も補酵素を介さず, 1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate (mPMS) を電子受容体とすることが考えられる. 一方, 本研究で用いた活性染色による DADH 活性の検出方法では, D-アミノ酸酸化酵素 (EC 1.4.3.3) も検出される可能性がある. しかしながら, 真正細菌やアーキアといった原核微生物では D-アミノ酸酸化酵素の報告例がない事, 又, 人工色素を電子受容体とする D-アミノ酸酸化酵素は全ての生物種において報告例が無いことから, GK1399 発現タンパク質に見出された酵素活性は DADH であると考えられる. 今後は, 本酵素を精製し, より詳細な酵素学的機能解析 (基質特異性, 安定性, 反応速度論解析等) を行う予定である. そして, 酵素の安定性や基質特異性から D-アミノ酸のバイオセンサー素子としての評価を行い, D-アミノ酸酵素分析法への応用を図る予定である.

文献

D'Aniello, G., Ronsini, S., Guida, F., Spinelli, P., D'Aniello, A. (2005). Occurrence of D-aspartic acid in human seminal plasma and spermatozoa: possible role in reproduction. *Fertility and sterility*, 84(5), 1444-1449.

- He, W., Li, C., Lu, CD. (2011). Regulation and characterization of the dadRAX locus for D-amino acid catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 193(9), 2107–2115.
- Jones, H. & Venables, WA. (1983). Effects of solubilisation on some properties of the membrane-bound respiratory enzyme D-amino acid dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Federation of European Biochemical Societies letters*, 151(2), 189–192.
- Katane, M. & Homma, H. (2011). D-Aspartate-An important bioactive substance in mammals: A review from an analytical and biological point of view. *Journal of Chromatography B*, 879 (29), 3108–3121.
- Nishikawa, T. (2011). Analysis of free d-serine in mammals and its biological relevance. *Journal of Chromatography B*, 879 (29), 3169–3183.
- Olsiewski, JP., Kaczorowski, GJ., Walsh, C. (1980). Purification and properties of D-amino acid dehydrogenase, an inducible membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme from *Escherichia coli* B. *The Journal of biological chemistry*, 255(10), 4487–4494.
- Satomura, T., Ishikura M., Koyanagi, T., Sakuraba, H., Ohshima T., Suye S. (2014). Dye-linked D-amino acid dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus* JCM9785: characteristics and role in trans-4-hydroxy-L-proline catabolism. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(10), 4265-4275.
- Satomura, T., Kawakami, R., Sakuraba, H., Ohshima, T. (2002). Dye-linked D-proline dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum* is a novel FAD-dependent amino acid dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry*, 277(15), 12861–12867.
- Tsukada, K. (1966). D-Amino acid dehydrogenases of *Pseudomonas fluorescens*. *The Journal of biological chemistry*, 241(19), 4522–4528.
- 上里彰仁. (2013). グルタミン酸/D-セリン系と精神疾患. *D-アミノ酸研究会誌* 1(1), 1-6.
- Wild, J., Walczak, W., Krajewska-Grynkiewicz, K., Klotowski, T. (1974). D-Amino acid dehydrogenase: the enzyme of the first step of D-histidine and D-methionine racemization in *Salmonella typhimurium*. *Molecular and general genetics*, 128(2). 131–146.

〔平成 27 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 27 年 7 月 31 日受理〕

Characterization of D-amino acid dehydrogenase gene from *Geobacillus kaustophilus*

Analysis of putative D-amino acid dehydrogenase gene

Tatsuki Sugawara¹, Yuta Mutaguchi¹

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

D-Amino acids have recently been proposed as useful diagnostic markers since the close relationships between D-amino acids and various diseases in human have been revealed. D-Amino acid dehydrogenases catalyze the dehydrogenation of various free D-amino acids in the presence of artificial electron acceptors. D-Amino acid enzyme assay procedures using D-amino acid dehydrogenase have been investigated as low-cost and simple D-amino acid analysis techniques. However, D-amino acid dehydrogenases from mesophiles show very low stability, and those reported in extreme thermophiles show low activity at normal temperature. Owing to the characteristics of the reported D-amino acid dehydrogenases, D-amino acid enzyme assay procedures using these enzymes have not yet been realized. In this study, we focused on a putative D-amino acid dehydrogenase gene (GK1399) in *Geobacillus kaustophilus* JCM 12893, and analyzed D-amino acid dehydrogenase activity of the recombinant protein expressed in *Escherichia coli* using activity-staining technique. As a result, we found that the recombinant protein expressed from GK1399 showed the activity band when D-proline was used as the substrate. Because this putative D-amino dehydrogenase is from a moderate thermophile, this enzyme is likely to show high stability and activity under various conditions and to be more useful for D-amino acid enzyme assay procedures.

Keywords: D-amino acid, dehydrogenase, thermophile